

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006634

International filing date: 05 April 2005 (05.04.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-121298  
Filing date: 16 April 2004 (16.04.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 26 May 2005 (26.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application: 2004年 4月16日

出願番号 Application Number: 特願2004-121298

パリ条約による外国への出願に用いる優先権の主張の基礎となる出願の国コードと出願番号

The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is

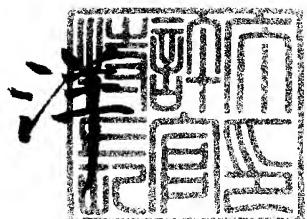
出願人 Applicant(s): 岡部 莢俊

J P 2004-121298

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

2005年 5月11日

小川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 4-1035741  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 G01N 1/00  
【発明者】  
【住所又は居所】 京都市伏見区南大島町101-5  
【氏名】 岡部 英俊  
【特許出願人】  
【識別番号】 502198847  
【住所又は居所】 京都市伏見区南大島町101-5  
【氏名又は名称】 岡部 英俊  
【代理人】  
【識別番号】 100088904  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 庄司 隆  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100124453  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 資延 由利子  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100129160  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 古館 久丹子  
【電話番号】 03-5822-5851  
【連絡先】 担当  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 067070  
【納付金額】 16,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

腫瘍関連因子の受容体を標的とする制癌剤の投与に際し行われる検査方法であって、該受容体の遺伝子及び／又は該遺伝子の発現産物の検査に加えて、細胞膜表面及び／又は細胞膜内で受容体に相互作用する物質の遺伝子及び／又は該遺伝子の発現産物を検査することを特徴とする制癌剤治療の有用性判定のための検査方法。

【請求項 2】

前記腫瘍関連因子の受容体が細胞増殖因子受容体である請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 3】

前記細胞増殖因子受容体が上皮細胞増殖因子受容体又は上皮細胞増殖因子受容体ファミリーに属する受容体である請求項 2 に記載の検査方法。

【請求項 4】

前記上皮細胞増殖因子受容体ファミリーに属する受容体がHER2/c-erbB-2である請求項 3 に記載の検査方法。

【請求項 5】

前記細胞膜表面及び／又は細胞膜内で受容体に相互作用する物質が糖蛋白質である請求項 1 から 4 のいずれか一に記載の検査方法。

【請求項 6】

前記糖蛋白質がムチン類である請求項 5 に記載の検査方法。

【請求項 7】

前記ムチン類がムチン4 (MUC4) である請求項 6 に記載の検査方法。

【請求項 8】

前記制癌剤が当該受容体に対する抗体である請求項 1 から 7 のいずれか一に記載の検査方法。

【請求項 9】

前記抗体がヒト化モノクローナル抗体である請求項 8 に記載の検査方法。

【請求項 10】

前記ヒト化モノクローナル抗体がトラスツズマブ (ハーセプチン登録商標) である請求項 9 に記載の検査方法。

【請求項 11】

請求項 1 から 10 のいずれか一に記載の検査方法に使用する試薬。

【請求項 12】

請求項 1 から 10 のいずれか一に記載の検査方法に使用する試薬キット。

【書類名】明細書

【発明の名称】悪性腫瘍の検査方法

【技術分野】

【0001】

本発明は悪性腫瘍の検査方法に関するものであり、細胞増殖因子受容体の受容体機能をヒト化モノクローナル抗体によって阻害しようとする治療法の治療方針、予後予測、および治療効果予測のための検査方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

癌の分子標的治療剤は、新しいタイプの制癌剤として従来の細胞標的治療剤と対比してその意義が注目されている。その中でも特にシグナル伝達阻害作用を有する薬剤が注目されている。

【0003】

c-erbB-2癌遺伝子は、細胞膜を貫通する受容体構造をもつ分子量185kDaの蛋白質(HER2/c-erbB-2)をコードしている(非特許文献1、2)。HER2/c-erbB-2はチロシンキナーゼ型受容体であり、ヒト上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)遺伝子と類似の構造を有するEGFRファミリーに属する。HER2/c-erbB-2の細胞外ドメインはレセプター構造になっており、細胞外リガンドがこの細胞外ドメインと結合し、細胞内ドメインにあるチロシンキナーゼが活性化する。このことによりHER2/c-erbB-2の自己リン酸化およびHER2/c-erbB-2と細胞内で相互作用する物質のリン酸化が引き起こされ、細胞表面から核への増殖シグナルが伝達され、細胞の増殖・分化に関与していると考えられている(非特許文献3)。HER2/c-erbB-2蛋白質は種々のヒトの腫瘍で過剰発現している。特に乳癌においては、c-erbB-2遺伝子またはその蛋白質の過剰発現のある患者は予後不良であり、診断、予後あるいは治療方針を決める上でc-erbB-2遺伝子は重要な因子の1つである。

【0004】

トラスツズマブ(ハーセプチニン登録商標)はHER2/c-erbB-2蛋白質に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体である。トラスツズマブ(ハーセプチニン登録商標)はHER2/c-erbB-2蛋白質を過剰発現している腫瘍細胞を標的として特異的に結合する。このことによりHER2/c-erbB-2蛋白質の受容体機能を阻害し、シグナル伝達を阻害することにより腫瘍細胞の増殖を阻害する。したがって、トラスツズマブ(ハーセプチニン登録商標)による治療対象患者の同定には、癌組織におけるHER2/c-erbB-2蛋白質の過剰発現あるいはc-erbB-2遺伝子増幅の状況についての検査が必要となる(非特許文献4)。

【0005】

現在、HER2/c-erbB-2の発現検査方法として、免疫組織化学法と蛍光in situハイブリダイゼーション法(FISH法)による方法が実施されている。

【0006】

HER2/c-erbB-2の発現の判定は、腫瘍細胞の膜における染色性およびその染色強度のみを対象とし、細胞質における反応は判定対象外とする。細胞膜における反応性は以下の基準でスコア0から3+のカテゴリーに分類される。

【0007】

スコア0；細胞膜に陽性染色がない、あるいは細胞膜の陽性染色がある腫瘍細胞<10%。  
スコア1+；ほとんど識別できないほどかすかな細胞膜の染色がある腫瘍細胞≥10%。  
スコア2+；弱～中程度の完全な細胞膜の陽性染色がある腫瘍細胞≥10%。  
スコア3+；強い完全な細胞膜の陽性染色がある腫瘍細胞≥10%。

【0008】

上記の基準に基づくHER2/c-erbB-2の発現の判定により、3+の場合はトラスツズマブ(ハーセプチニン登録商標)による治療の有用性があると評価されるが、2+の場合については評価が分かれている。つまり、3+の場合はトラスツズマブ(ハーセプチニン登録商標)による治療に一定の効果が認められているが、2+の場合は必ずしもトラスツズマブ(ハーセプチニン登録商標)による治療が有効な症例は多くない。これに対し、FISH法で陽性

の場合は一定の割合においてトラスツズマブ（ハーセプチン登録商標）による治療が有効であるとされている。

#### 【0009】

組織切片の免疫組織化学的染色は、異種組織の蛋白質の変化を評価する確実な方法であることが示されている。免疫組織化学法は、抗体をプローブに利用し、一般的には発色法又は蛍光法によって *in situ* で細胞に存在する抗原を視覚化して検査する方法である。

#### 【0010】

蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法（FISH法）は、近年、無傷の細胞にある遺伝子の存在を直接評価する方法を発達させている。FISH法とは、蛍光色素やハプテンで標識したDNAやRNAプローブを用いて、スライドに固定された細胞又は組織切片内の細胞RNA又は細胞DNAに結合させ、その後蛍光顕微鏡下で、その遺伝子を蛍光シグナルとして検出する方法である。

#### 【0011】

免疫組織化学法とFISH法について、HER2/c-erbB-2の発現の検査における有効性の比較が行われた。その結果、FISH法の方が免疫組織化学法より再現性に優れており、HER2/c-erbB-2の発現の状態をより正確に判断できる、という結論が出ている。さらに、FISH法で陽性の場合におけるトラスツズマブ（ハーセプチン登録商標）による治療の有効例の比率は、免疫組織化学法で陽性の場合より多いとされている。しかし、FISH法は手数およびコストがかかることから、免疫組織化学法で20の場合にのみFISH法を実施して、トラスツズマブ（ハーセプチン登録商標）による治療の有用性を決めるのが良い、という結論が出されている（非特許文献5）。

#### 【0012】

ムチン4（MUC4）は細胞膜内HER2/c-erbB-2結合体である（非特許論文6）。さらに、HER2/c-erbB-2を発現し、MUC4/シアロムチンのない細胞にMUC4/シアロムチンをトランスフェクトするとHER2/c-erbB-2の1248番目のチロシンがリン酸化されることから、MUC4/シアロムチンはHER2/c-erbB-2のリン酸化にも関係している（非特許論文6）。

【非特許文献1】 Biochem. et Biophys. Acta, 1198, 165-184 (1994)

【非特許文献2】 Oncogene, 9, 2109-2123 (1994)

【非特許文献3】 Brit. J. Cancer, 72, 1259-1266 (1995)

【非特許文献4】 Science, 235, 177-182 (1987)

【非特許文献5】 J. Pathology, 199, 411-417 (2003)

【非特許文献6】 J. Biol. Chem., 278, 30142-30147 (2003)

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0013】

本発明が解決しようとする課題は、腫瘍関連因子の受容体を標的とする制癌剤治療の有効性を正確に判定するための新たな検査方法を提供することである。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0014】

上記課題を解決するため、本発明者は腫瘍関連因子の受容体であるHER2/c-erbB-2を標的とする制癌剤であるトラスツズマブ（ハーセプチン登録商標）の有効性を正確に判定するための検査方法について検討した。

#### 【0015】

トラスツズマブ（ハーセプチン登録商標）の有効性の判定は、現在はHER2/c-erbB-2の過剰発現を免疫組織化学法、FISH法等で検査している。前記の検査方法では、蛋白質が細胞膜において染色されている場合にのみ陽性と判断し、細胞質内の染色性は陰性とする。ここで、トラスツズマブ（ハーセプチン登録商標）による治療が有効に作用する条件として、過剰発現したHER2/c-erbB-2が細胞膜上で受容体として機能的に存在している必要がある。したがって、前記の検査方法ではc-erbB-2遺伝子がいくら過剰発現され、HER2/c-erbB-2が多量に作成されたとしても、細胞膜に上手くアンカーされていなければトラ

スツズマブ（ハーセプチン登録商標）による治療の有効性が無いということになる、と本発明者は考えた。

#### 【0016】

また、HER2/c-erbB-2の過剰発現を高頻度に認める癌はかなり多種にわたる。現在、乳ガンでトラスツズマブ（ハーセプチン登録商標）による治療が実用化されているものの、他臓器の癌では該治療が有効な症例比率が低く、ほとんど実用化されていない。本発明者は、この理由として過剰発現しているHER2/c-erbB-2が細胞膜上で機能していない可能性を推定した。したがって、HER2/c-erbB-2が細胞膜での機能を果たすために重要である、細胞膜表面及び／又は細胞膜内でHER2/c-erbB-2に相互作用する物質の有無を個々の癌について予め検討しておくことは、トラスツズマブ（ハーセプチン登録商標）による治療効果を推定する上で非常に有用であると本発明者は考えた。

#### 【0017】

そこで、HER2/c-erbB-2を過剰発現した癌に対しトラスツズマブ（ハーセプチン登録商標）による治療を受けた症例について、HER2/c-erbB-2が細胞膜上で受容体として有効に機能するために細胞膜表面及び／又は細胞膜内でHER2/c-erbB-2に相互作用する物質MUC4の発現状況とトラスツズマブ（ハーセプチン登録商標）による治療の有効性との関係を検討した。

#### 【0018】

その結果、腫瘍関連因子の受容体を標的とする制癌剤治療の有用性判定の検査方法における、細胞膜表面及び／又は細胞膜内で受容体に相互作用する物質の遺伝子及び／又は該遺伝子の発現産物を検査することの意義を見出し、本発明を完成した。

#### 【0019】

つまり、本発明は以下からなる：

1. 腫瘍関連因子の受容体を標的とする制癌剤の投与に際し行われる検査方法であって、該受容体の遺伝子及び／又は該遺伝子の発現産物の検査に加えて、細胞膜表面及び／又は細胞膜内で受容体に相互作用する物質の遺伝子及び／又は該遺伝子の発現産物を検査することを特徴とする制癌剤治療の有用性判定のための検査方法。
2. 前記腫瘍関連因子の受容体が細胞増殖因子受容体である前項1に記載の検査方法。
3. 前記細胞増殖因子受容体が上皮細胞増殖因子受容体ファミリーに属する受容体である前項2に記載の検査方法。
4. 前記上皮細胞増殖因子受容体ファミリーに属する受容体がHER2/c-erbB-2である前項3に記載の検査方法。
5. 前記細胞膜表面及び／又は細胞膜内で受容体に相互作用する物質が糖蛋白質である前項1から4のいずれか一に記載の検査方法。
6. 前記糖蛋白質がムチン類である前項5に記載の検査方法。
7. 前記ムチン類がムチン4（MUC4）である前項6に記載の検査方法。
8. 前記制癌剤が当該受容体に対する抗体である前項1から7のいずれか一に記載の検査方法。
9. 前記抗体がヒト化モノクローナル抗体である前項8に記載の検査方法。
10. 前記ヒト化モノクローナル抗体がトラスツズマブ（ハーセプチン登録商標）である前項9に記載の検査方法。
11. 前項1から10のいずれか一に記載の検査方法に使用する試薬。
12. 前項1から10のいずれか一に記載の検査方法に使用する試薬キット。

#### 【発明の効果】

#### 【0020】

本発明により、腫瘍関連因子の受容体を標的とする制癌剤治療の有用性判定の予測がより確実に可能となる。さらに、このことにより的確な治療方針の立案が可能となり、治療効果が期待できない癌に対する過剰な投薬を抑制できる等、医療経済に対しても効果が期待できる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0021】

以下、本発明を詳しく説明するが、本明細書中で使用されている技術的および科学的用語は、別途定義されない限り、本発明の属する技術分野において通常の知識を有する者により普通に理解される意味を持つ。

## 【0022】

本発明は腫瘍関連因子の受容体を標的とする制癌剤の投与に際し行われる、制癌剤治療の有用性判定のための検査方法であり、該受容体の遺伝子及び／又は該遺伝子の発現産物の検査に加えて、細胞膜表面及び／又は細胞膜内で受容体に相互作用する物質の遺伝子及び／又は該遺伝子の発現産物を検査することを特徴とする。

## 【0023】

腫瘍とは、生体内においてその個体自身に由来する細胞でありながら、その個体全体としての調和を破り、他からなんら制御を受けることなく自らの規律に従い、過剰の発育を遂げる組織をいう。腫瘍関連因子とは、腫瘍形成に関与する因子をいう。腫瘍関連因子としては、サイトカインが好ましい。サイトカインには、これに限られないが、増殖因子、インターフェロン（IFN）、腫瘍壞死因子（TNF）、インターロイキン（IL）等が含まれる。サイトカインのなかでも増殖因子がさらに好ましい。増殖因子には、これに限られないが、上皮細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、纖維芽細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、インシュリン様増殖因子、血管内皮増殖因子等が含まれる。

## 【0024】

受容体とは、細胞が特定の化学物質を認識するための蛋白質よりなる構造体をいう。化学伝達物質、各種細胞成長因子等は細胞膜上に存在するそれそれに特異的な受容体と結合することにより、細胞内への効率的な取り込み、細胞内へのシグナル伝達等を発揮している。腫瘍関連因子の受容体としては、細胞増殖因子受容体が好ましく、上皮細胞増殖因子受容体及びそのファミリーに属する受容体がより好ましい。上皮細胞増殖因子受容体ファミリーに属する受容体として、HER2/c-erbB-2が好適な例として挙げられる。

## 【0025】

細胞膜表面及び／又は細胞膜内で受容体に相互作用する物質とは、細胞膜表面及び／又は細胞膜内において受容体に相互作用し、受容体の機能を発現あるいは増強させる役割を担う物質をいう。細胞膜表面及び／又は細胞膜内で受容体に相互作用する物質としては、糖蛋白質が好ましく、ムチン類がより好ましい。ムチン類の一部は癌抗原として知られている。ムチン類の中でも、MUC4は細胞内でHER2/c-erbB-2蛋白質と相互作用することが知られており、好適な例として挙げられる。

## 【0026】

制癌剤とは、悪性腫瘍に対して用いられる薬物の総称であり、癌遺伝子の発現及び／又は発現産物の機能を抑制する。本発明の制癌剤は、腫瘍関連因子の受容体を標的とする。この各定義は上述した。このような制癌剤としては、癌の分子標的治療剤が例示される。特にシグナル伝達作用を阻害する薬剤が代表的であり、いわゆるチロシンキナーゼ阻害剤等が例示される。そのようなものには例えは、微生物由来のアーブスタチン（Erbstatin）、ラベンダスチン（Lavendustin）、ハービマイシンA（Herbimycin A）、ゲニステイン（Genistein）等、化学合成品では、ベンジリデンマロンニトリル誘導体（特開平2-138238号公報、Journal of Medical Chemistry, 32, 2344 (1989); 同34, 1896 (1991)）、 $\alpha$ -シアノケイ皮酸アミド誘導体（特開昭63-222153号公報）、3, 5-ジイソプロピル-4-ヒドロキシスチレン誘導体（特開昭62-39522号公報）、3, 5-ジープチル-4-ヒドロキシスチレン誘導体（特開昭62-39523号公報）、アーブスタチン類縁化合物（特開昭62-277347号公報）等がある。

## 【0027】

制癌剤としては、シグナル伝達系に関与する産物に対する抗体が好ましく、ヒト化モノクローナル抗体がより好ましい。シグナル伝達系に関与する産物としては各受容体があり、各受容体に対する抗体が例示される。代表的な受容体としては、HER2/c-erbB-2が例示される。さらに、HER2/c-erbB-2に対するヒト化モノクローナル抗体であるトラスツズマ

ブ（ハーセプチン登録商標）が好適に例示される。この他、本発明の対象となる制癌剤の分子標的治療剤としては、ZD1839（イレッサ登録商標）、STI-571等が例示される。ZD1839（イレッサ登録商標）はEGFRのチロシンキナーゼ活性の阻害剤であり、STI-571はBCR-Ab1及びc-kitのチロシンキナーゼ活性の阻害剤である。

#### 【0028】

ガン（癌）とは、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理的状態をいう。ガンの例には、これらに限定されるものではないが、ガン腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、黒色腫及び白血病が含まれる。このようなガンのより特定の例には、扁平細胞ガン、小細胞肺ガン、非小細胞肺ガン、肺の腺ガン、肺の扁平ガン腫、腹膜ガン、肝細胞ガン、胃腸ガン、脾臓ガン、神経膠芽細胞腫、子宮頸管ガン、非小細胞肺ガン、卵巣ガン、肝臓ガン、膀胱がん、肝ガン、乳ガン、大腸ガン、結腸直腸ガン、子宮内膜ガン又は子宮ガン、唾液腺ガン、腎臓ガン、前立腺ガン、産卵口ガン、甲状腺ガン、並びに様々な型の頭部及び頸部のガンが含まれる。

#### 【0029】

シグナル伝達系に関与する産物をコードする遺伝子としては、細胞が癌化する際に癌化の指令を発する遺伝子が例示される。このような遺伝子には、これらに限定されるものではないが、増殖因子機能を有するsis、int-2、hst、受容体型チロシンキナーゼ機能を有するerbB、erbB-2/neu、ros、fms、kit、ret、非受容体型チロシンキナーゼ機能を有するsrc、yes、fgr、lck、fps/fes、abl、セリン・スレオニンキナーゼ機能を有するc-raf、その他ras、bcl、int-1、crk、核内蛋白質であるmyc、fos、jun、erbA等が含まれる。これらの各遺伝子の中で、その機能あるいは発現産物の機能を抑制させる物質が開発され、医薬品として用いられる。代表例として、抗体薬剤として用いられている、erbB-2/neuの遺伝子産物であるHER2/c-erbB-2に対するトラスツズマブ（ハーセプチン登録商標）が好適な例として挙げられる。

#### 【0030】

本発明に使用される検体試料としては対象からのあらゆる組織試料が用いられる。組織試料は、好ましくは染色体物質を有する有核細胞を含む、対象又は患者の組織から得られた類似細胞の集合を意図している。組織試料は、保存料、抗凝固剤、バッファー、固定剤、栄養分、抗生物質等の天然で組織に本質的に混入しない成分を含んでいてもよい。使用される組織試料の例には、これに限られないが、乳房、前立腺、卵巣、大腸、肺、子宮内膜、胃、唾液腺、又は脾臓が含まれる。組織試料はこれに限られないが、外科的切除、吸引、又はバイオプシーを含む様々な方法で得ることができる。組織は生でも凍結されていてもよい。

#### 【0031】

組織試料は、従来からの方法によって固定することができる。固定剤は組織が組織学的に染色されるように又は他の方法で分析されるように決定される。また、固定の長さは組織試料の大きさ及び使用される固定剤による。

一般に組織試料を初めに固定し、次いでアルコールの上昇系列で脱水し、パラフィン又は組織試料を切片にできるような他の切片法媒体を浸透して包埋する。あるいは、組織を切片化し、得られた切片を固定できるようにする。例えば、組織試料は従来からの方法によりパラフィンで包埋及び加工されうる。組織試料が包埋されると、試料はミトクローム等により切片化されうる。切片化されると、切片は幾つかの標準的な方法でスライドに貼り付けられうる。

#### 【0032】

パラフィンが包埋の材料として使用された場合、組織切片は一般に脱パラフィンし、水で再水和する。組織切片は幾つかの従来からの標準的な方法で脱パラフィンをすることができる。例えば、キシレン及び緩やかな下降系列アルコールを使用することができる。

#### 【0033】

遺伝子及び／又は該遺伝子の発現産物の検査方法として、遺伝子検査法と免疫学的検査法が挙げられる。さらに、本発明には、遺伝子検査法と免疫学的検査法の併用、さらに他

の検査方法との併用も含まれる。

#### 【0034】

遺伝子検査法とは、遺伝子増幅を検査する方法であり、FISH法、RT-PCR法、サザンブロットティング等の従来からの方法が用いられる。ここで、遺伝子増幅とは、染色補体の腫瘍抗原コーディング遺伝子の一以上の付加的な遺伝子複製物の存在を意図している。遺伝子増幅は蛋白質の過剰発現を生じうる。遺伝子検査法に用いるプローブは、RNA又はDNAのオリゴヌクレオチドでもポリヌクレオチドでもよい。プローブは、安定した特異的な結合が標的核酸プローブとの間に生じるよう、対象とする標的核酸配列と十分な相補性を有しうる。安定したハイブリダイゼーションに必要な相同性の程度は、ハイブリダイゼーション媒体及び／又は洗浄媒体の厳密性により変化する。プローブの選択は標的遺伝子の性質に依存する。

#### 【0035】

免疫学的検査法とは、遺伝子の発現産物を抗体により検査する方法であり、免疫組織化学法、ELA法等の従来からの方法が用いられる。免疫学的検査法に使用する抗体類には、これに限定されないが、モノクローナル抗体類、ポリクローナル抗体類及びその断片が含まれる。

#### 【0036】

以下の方法は、HER2/c-erbB-2を特異的に認識する抗体を利用する免疫組織化学染色法の一例である：

通常の方法に従い調製されたパラフィン包埋された組織の切片を、キシレン溶液及び下降系列アルコール溶液により脱パラフィンし、蒸留水で洗浄する。次に、内在性のペルオキシダーゼ活性を除去する為に、室温で30分間0.3%過酸化水素を含むメタノールで前記切片を反応させ、0.1MPBSで5分間3回洗浄する。次に、非特異的な反応を阻害するため前記切片を2-10%の正常血清を含む0.1MPBSで室温にて30-60分間インキュベートした後、HER2/c-erbB-2を認識する一次抗体で室温にて1時間又は4°Cで一昼夜インキュベートする。その後、前記切片を0.1MPBSで5分間3回洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識二次抗体とともに室温にて30分間インキュベートする。次に0.1MPBSで前記切片を5分間3回洗浄後、DAB反応液（DAB四塩酸塩10mg、PBS50ml、1.5%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>50μl）で3-10分間インキュベートして発色させ、10分間流水洗浄して発色反応を停止させる。

#### 【0037】

本発明の一実施態様では、腫瘍関連因子の受容体の遺伝子及び／又は該遺伝子の発現産物の検査方法により、該受容体の遺伝子及び／又は該遺伝子の発現産物に加えて細胞膜表面及び／又は細胞膜内で受容体に相互作用する物質の遺伝子及び／又は該遺伝子の発現産物が検体試料において検出される症例では、該受容体を標的とする制癌剤治療の有用性があると判定することができる。

#### 【0038】

その一例として、HER2/c-erbB-2は、乳ガンに限らず多くの癌で過剰発現しているにもかかわらず、治療が実用化されているのは乳ガンのみである。これは、乳ガン以外のHER2/c-erbB-2を高発現する癌における治療の有効率が低いためである。大腸ガンなどは、HER2/c-erbB-2の過剰発現が高頻度であるが、基本的にMUC4は大腸の上皮では腫瘍も含め陰性であることがわかっており、治療効果が出にくいためである。しかしながら、MUC4陽性である臓器の癌においてはHER2/c-erbB-2を高度発現するものもある。それらの癌については、MUC4とHER2/c-erbB-2をともに発現している症例を選んでトラスツズマブ（ハーセプチエン登録商標）による治療を試行により高い治療効果が得られる可能性があると判定することができる。したがって、MUC4とHER2/c-erbB-2の検査の併用により、トラスツズマブ（ハーセプチエン登録商標）による治療の適応の範囲を広げることが可能となる。

#### 【0039】

さらに、本発明の一実施態様では、本発明の検査方法に使用することができる試薬および試薬キットを含む。試薬および試薬キットは製造品の形で提供されてもよく、製造品は容器、場合によってはラベル及びパッケージ挿入物を具備する。

## 【実施例】

### 【0040】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、これらは本発明の技術的範囲を限定するものではない。

### 【0041】

#### 実施例1

乳癌患者の組織について、上述の免疫組織化学的染色によりHER2/c-erbB-2を検出した症例について、トラスツズマブ（ハーセプチ<sup>登録商標</sup>）による治療効果と免疫組織化学法によるMUC4の染色性の関係について調べた。

その結果、表1に示すような結果が得られた。HER2/c-erbB-2が（++）以上である6例うち、MUC4陽性は3例中1例が（+++）、2例中2例が（+）であった。この結果から、HER2/c-erbB-2とMUC4の発現は相関しないことが明らかになった。従って、HER2/c-erbB-2とMUC4のそれぞれを検査する意義があることが示された。HER2/c-erbB-2陽性（+++）の3例のうち完全覚解した1例はMUC4陽性で、効果なしであった1例はMUC4陰性であり余り効果がなく、トラスツズマブ（ハーセプチ<sup>登録商標</sup>）による治療の拒絶が1例であった。HER2/c-erbB-2陽性（+）である2例はいずれもMUC4陽性であり、うち1例はStageが早いためトラスツズマブ（ハーセプチ<sup>登録商標</sup>）による治療をしていないが、トラスツズマブ（ハーセプチ<sup>登録商標</sup>）による治療例は完全覚解であった。

以上より、MUC4の発現とHER2/c-erbB-2の発現は必ずしも平行関係になく、MUC4陽性かつHER2/c-erbB-2陽性（++）以上の症例はトラスツズマブ（ハーセプチ<sup>登録商標</sup>）に対する反応性が良いが、MUC4陰性の場合はHER2/c-erbB-2陽性でもトラスツズマブ（ハーセプチ<sup>登録商標</sup>）による治療が効果的でないことが判った。したがって、HER2/c-erbB-2とMUC4を組み合わせて検査することによりトラスツズマブ（ハーセプチ<sup>登録商標</sup>）による治療効果を予測できることが判った。

### 【0042】

#### 【表1】

乳癌の種類	HER2/c-erbB-2	MUC4	トラスツズマブ（ハーセプチ <sup>登録商標</sup> ）による治療効果
乳頭腺管癌	(-)	(-)	適応外
乳頭腺管癌	(-)	(+)	適応外
乳頭腺管癌	(-)	(-)	適応外
乳癌	(-)	(-)	適応外
乳癌	(+++)	(-)	余り奏効せず、患者が治療を続行拒否、死亡
乳頭腺管癌	(+++)	(-)	効果なし: 注:タモキシフェン/ハーセプチ <sup>登録商標</sup> 奏効後、タモキシフェン抜去で効果消失
乳頭腺管癌	(+++)	(+)	完全覚解
乳頭腺管癌	(+++)	(-)	効果なし
乳頭腺管癌	(+++)	(+)	完全覚解
乳頭腺管癌	(++)	(+)	治療せず
乳頭腺管癌	(+)	(-)	治療せず
乳頭腺管癌	(-)	(-)	治療せず
乳頭腺管癌	(+)	(+)	治療せず

## 【産業上の利用可能性】

### 【0043】

本発明により、腫瘍関連因子の受容体を標的とする制癌剤治療の有用性判定の予測がより確実に可能となり、制癌剤治療を受ける対象の選別及び選択の確実性を著しく向上させる可能性をもたらす。このことにより、的確な治療方針を提供し、制癌剤の治療の適用の範囲を広げることが可能となる。さらに、治療効果が期待できない癌に対する過剰な投薬を抑制できる等、医療経済に対しても効果が期待できる。

【書類名】要約書

【要約】

【課題】

腫瘍関連因子の受容体を標的とする制癌剤の投与に際し、制癌剤治療の有効性を正確に判定するための新たな検査方法を提供すること。

【解決手段】

制癌剤トラスツズマブ（ハーセプチニ登録商標）の有効性の判定に際し、上皮細胞増殖因子受容体ファミリーに属するHER2/c-erbB-2に細胞膜表面及び／又は細胞膜内で相互作用する物質であるMUC1の発現の検査の意義を見出した。このことから、諸種の癌において腫瘍関連因子の受容体を標的とする制癌剤による治療を開始する前の検査方法として、該受容体に対する細胞内リガンドの発現の検索の意義を確立し、本発明を完成した。

【書類名】 手続補正書（方式）  
【整理番号】 4-1035741  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
  【出願番号】 特願2004-121298  
【補正をする者】  
  【識別番号】 502198847  
  【氏名又は名称】 岡部 英俊  
【代理人】  
  【識別番号】 100088904  
  【弁理士】  
  【氏名又は名称】 庄司 隆  
【発送番号】 039650  
【手続補正1】  
  【補正対象書類名】 特許願  
  【補正対象項目名】 特許出願人  
  【補正方法】 変更  
  【補正の内容】  
    【特許出願人】  
    【識別番号】 502198847  
    【住所又は居所】 京都市伏見区桃山南大島町101-5  
    【氏名又は名称】 岡部 英俊  
【手続補正2】  
  【補正対象書類名】 特許願  
  【補正対象項目名】 発明者  
  【補正方法】 変更  
  【補正の内容】  
    【発明者】  
    【住所又は居所】 京都市伏見区桃山南大島町101-5  
    【氏名】 岡部 英俊

出願人履歴

5 0 2 1 9 8 8 4 7

20020603

新規登録

〒612-8017 京都市伏見区桃山南大島町101-5

岡部 英俊